

# RUCHY CHLOROPLASTÓW INDUKOWANE ŚWIATŁEM NIEBIESKIM

## BLUE-LIGHT INDUCED CHLOROPLAST MOVEMENTS

Aleksandra ECKSTEIN

Zakład Biotechnologii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki  
i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie:* Ruchy chloroplastów stanowią jeden z mechanizmów aklimacji roślin do zmian natężenia światła. Występują one powszechnie w świecie roślin, w obrębie różnych grup taksonomicznych. Pod wpływem słabego światła chloroplasty wykonują reakcję akumulacji, przemieszczając się pod ściany komórki prostopadłe do kierunku padania światła. Służy to optymalizacji fotosyntezy poprzez zwiększenie powierzchni absorpcji światła przez chloroplasty. W silnym świetle chloroplasty ustawiają się wzdłuż ścian komórki równoległych do kierunku padania światła. Jest to reakcja ucieczki, która chroni chloroplasty przed uszkodzeniami spowodowanymi przez silne światło. W nasiennych roślinach lądowych ruchy chloroplastów kontrolowane są przez fotoreceptory światła niebieskiego – fototropiny. Mechanizm ruchu oparty jest na cytoszkieletcie aktynowym. Proces przekazu sygnału od fototropin do układu efektorowego nie jest w pełni poznany. Specyficzne role poszczególnych białek i wtórnych przekaźników sygnału w reakcjach akumulacji i ucieczki wskazują na istnienie odrębnych ścieżek sygnałowych kontrolujących obie odpowiedzi. Do zrozumienia tych procesów przyczyniają się też badania interakcji między ścieżką przekazu sygnału od fototropin a innymi szlakami sygnałowymi. Jest to szczególnie ważne w kontekście fizjologicznej roli ruchów chloroplastów – jako odpowiedzi na zmienne warunki otoczenia.

*Słowa kluczowe:* ruchy chloroplastów, fototropiny, światło niebieskie

*Summary:* Chloroplast movements are one of the mechanisms enabling plant acclimation to changing light intensity. They are widespread in the plant kingdom, in different taxonomic groups. In weak light chloroplasts perform the accumulation response, positioning themselves under the cell walls perpendicular to the direction of incident light. This allows to optimize photosynthesis by increasing the area of light absorption by chloroplasts. In strong light chloroplasts move towards the cell walls parallel to the light direction. This avoidance response protects chloroplasts against damage by excess light. In terrestrial angiosperms chloroplast relocation are controlled by blue light photoreceptors – phototropins. The movement mechanism is based on the actin cytoskeleton.

However, the signal transduction pathway from phototropins to the effector proteins is still not fully understood. Specific roles of several proteins and secondary messengers in chloroplast accumulation and avoidance point to the existence of separate signaling pathways for both responses. The study of cross-talk with other signal transduction pathways contributes to better understanding of phototropin signaling in chloroplast movements. This is especially important in the context of the physiological role of chloroplast relocations – as a response to changing environmental conditions.

*Key words:* chloroplast movement, phototropins, blue light

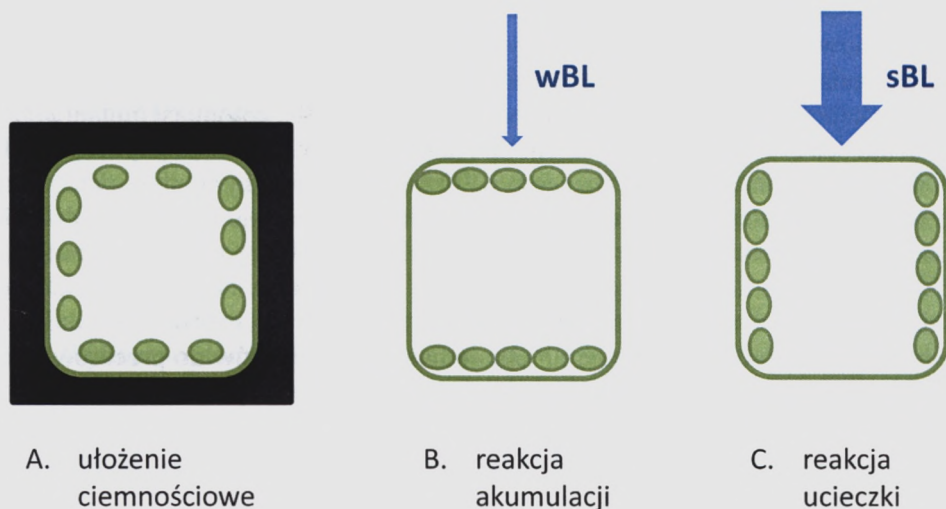
## RUCHY CHLOROPLASTÓW – ODPOWIEDŹ ROŚLIN NA ZMIENNE WARUNKI ŚWIETLNE

Jednym z mechanizmów aklimacji roślin do zmian natężenia światła są ruchy chloroplastów. W ciemności chloroplasty umiejscowione są zazwyczaj pod wszystkimi ścianami komórki i nie zmieniają położenia. Na przykładzie *Arabidopsis thaliana* wykazano, że rozmieszczenie to nie jest równomierne i zależy od warunków świetlnych w czasie hodowli [91]. Pod wpływem słabego światła chloroplasty wykonują reakcję akumulacji, przemieszczając się pod ściany komórki prostopadłe do kierunku padania światła i przyjmując położenie płaskie. W silnym świetle następuje reakcja ucieczki chloroplastów. Wówczas ustawiają się one wzdłuż ścian komórki równoległych do kierunku padania światła przyjmując położenie profilowe (ryc. 1). Obie reakcje pełnią ważne funkcje fizjologiczne. Reakcja akumulacji służy optymalizacji fotosyntezy przez zwiększenie powierzchni absorpcji światła przez chloroplasty w warunkach słabego oświetlenia [87, 99]. Reakcja ucieczki pełni natomiast rolę fotoprotekcyjną, chroniąc chloroplasty przed uszkodzeniami spowodowanymi przez silne światło [48, 83].

Kierunkowe ruchy chloroplastów wywołane światłem są zjawiskiem występującym powszechnie w świecie roślin, w obrębie różnych grup taksonomicznych. Zostały one opisane w glonach (m. in. *Mougeotia scalaris*, *Mesotaenium* sp.), mszakach (m. in. *Physcomitrella patens*, *Funaria hygrometrica*), paprotnikach (m. in. *Adiantum capillus-veneris*, *Pteris cretica*), okrytozalążkowych roślinach wodnych (m.in. *Lemna trisulca*, *Vallisneria* sp.) i lądowych (m. in. *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Tradescantia albiflora*) [28]. We wszystkich tych grupach roślin przemieszczenia chloroplastów przebiegają zgodnie z tym samym schematem: z silnie oświetlonych do słabiej oświetlonych części komórki. Mechanizmy leżące u podstaw tego ruchu różnią się jednak dość znacznie w zależności od grupy taksonomicznej, a nawet gatunku. Istotne różnice dotyczą przede wszystkim długości fali światła wywołującego ruch, a tym samym zaangażowanych fotoreceptorów, udziału płynięcia cytoplazmy oraz roli cytoszkieletu [9, 28]. W nasiennych roślinach lądowych ruchy chloroplastów indukowane są wyłącznie

światłem niebieskim, natomiast w szeregu innych gatunków aktywne jest również światło czerwone (m. in. *Mougeotia scalaris*, *Physcomitrella patens*, *Adiantum capillus-veneris*, *Vallisneria* sp.) [9, 28]. Z kolei ruch cytoplazmy odgrywa rolę w przemieszczeniach chloroplastów przede wszystkim w roślinach wodnych. W komórkach większości badanych gatunków cytoszkielet aktynowy stanowi kluczowy element układu efektorowego ruchu chloroplastów. Wykazano jednak, że mechanizmy jego funkcjonowania mogą być różne: w wyższych roślinach lądowych (*A. thaliana*, *N. tabacum*) nie zaobserwowano zmian w organizacji aktyny pod wpływem światła niebieskiego [4, 55], tymczasem np. w *Vallisneria gigantea* opisano bardzo charakterystyczne zmiany w architekturze cytoszkieletu towarzyszące przemieszczeniom chloroplastów [74]. Ponadto w mchu *Physcomitrella patens* wykazano, że cytoszkielet mikrotubularny jest zaangażowany w ruch chloroplastów [76].

Obecnie najlepiej poznane jest funkcjonowanie ruchów chloroplastów w lądowych roślinach nasiennych, w szczególności w modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*. W gatunku tym odkryto fotoreceptory światła niebieskiego odpowiedzialne za ruch chloroplastów, fototropinę 1 i 2, oraz zidentyfikowano szereg elementów szlaku sygnałowego. Mimo to ścieżka przekazu sygnału od fotore-



**RYCINA 1.** Schemat typowego rozmieszczenia chloroplastów w komórce mezofilu (przekrój poprzeczny) w różnych warunkach oświetlenia: (A) po adaptacji do ciemności oraz pod wpływem (B) słabego (wBL) i (C) silnego (sBL) światła niebieskiego. Strzałki wskazują kierunek padania światła

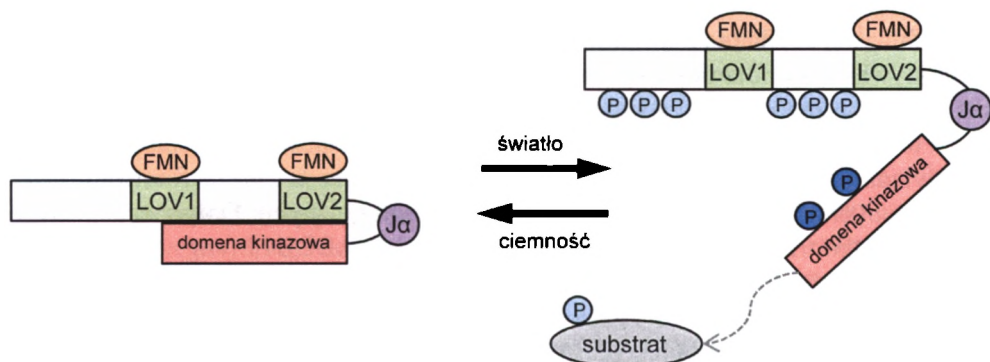
**FIGURE 1.** Schematic representation of chloroplast distribution in mesophyll cells (transverse sections) in different light conditions: (A) after dark-adaptation and under (B) weak (wBL) and (C) strong (sBL) blue light. Arrows show the direction of incident light

ceptorów do układu efektorowego ruchu chloroplastów wciąż nie jest w pełni znana. Do zrozumienia tej ścieżki sygnałowej przyczyniają się też badania interakcji między przekazem sygnału od fototropin a innymi szlakami sygnałowymi. Jest to szczególnie ważne w kontekście fizjologicznej roli ruchów chloroplastów – jako odpowiedzi na zmienne warunki otoczenia.

## FOTOTROPINY – RECEPTORY ŚWIATŁA NIEBIESKIEGO

W roślinach znanych jest obecnie pięć typów fotoreceptorów: fitochromy wrażliwe na światło czerwone i dalekiej czerwieni, fototropiny, kryptochromy i białka ZTL/FKF1/LKP2 (ang. *Zeitlupe/Flavin-binding, Kelch repeat, F-box/Lov Kelch Protein2*) wrażliwe na światło niebieskie i UV-A (320-500 nm) oraz receptor UV-B UVR8 [29]. W *A. thaliana* występują dwie fototropiny: phot1 i phot2. Fototropina1 została najpierw odkryta jako fotoreceptor kontrolujący fototropizm [15], dopiero później przypisano jej rolę w ruchu chloroplastów [72]. Fototropina2 została natomiast zidentyfikowana jako fotoreceptor odpowiedzialny za reakcję ucieczki chloroplastów [43, 45]. W *A. thaliana* typu dzikiego reakcja akumulacji wywoływana jest przez światło niebieskie o natężeniu  $0,08\text{--}4\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a reakcja ucieczki – przez światło niebieskie o natężeniu powyżej  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [91]. Badania mutantów fototropinowych *A. thaliana* pozwoliły dokładnie określić udział obu fotoreceptorów w regulacji odpowiedzi chloroplastów na światło. W mutancie *phot2* występuje tylko reakcja akumulacji, niezależnie od natężenia światła, natomiast mutant *phot1* wykazuje oba typy reakcji, przy czym do ich wywołania konieczne jest nieco wyższe natężenie światła niż w roślinach typu dzikiego. Podwójny mutant *phot1phot2* nie wykazuje odpowiedzi chloroplastów na światło niebieskie [72]. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że obie fototropiny kontrolują reakcję akumulacji, natomiast reakcja ucieczki wymaga obecności fototropiny2. Następnie wykazano udział fototropin w szeregu innych odpowiedzi wzrostowych i ruchowych na światło niebieskie. Oprócz fototropizmu i akumulacji chloroplastów do procesów kontrolowanych przez obie fototropiny należą: ruch aparatów szparkowych oraz ustawianie i spłaszczanie liści. Zauważono też, że w odpowiedziach tych fototropina1 odznacza się większą wrażliwością na światło niż fototropina2 [18]. Zahamowanie wzrostu hipokotyla oraz wzrostu korzeni bocznych jest natomiast kontrolowane tylko przez fototropinę1, a ciemnościowe ułożenie chloroplastów w komórkach miękkiszu palisadowego i ruch jądra – wyłącznie przez fototropinę2 [18, 79].

Obie fototropiny *A. thaliana* mają bardzo podobną budowę. W białkach tych wyróżnić można dwie części: N-kończową część fotosensoryczną i C-kończową część kinazową [12]. W części N-końcowej znajdują się dwie domeny LOV (ang. *Light, Oxygen, Voltage*), z których każda wiąże mononukleotyd flawinowy (FMN), pełniący funkcję chromoforu. C-kończowa część białka zawiera domenę



**RYCINA 2.** Schemat budowy fototropin i zmian konformacyjnych zachodzących pod wpływem światła niebieskiego. FMN, mononukleotyd flawinowy; J $\alpha$ , J $\alpha$ -helisa; LOV, domena regulowana światłem, tlenem i napięciem (Light, Oxygen Voltage); P, miejsca fosforylacji (kolor ciemnoniebieski – konserwatywne reszty serynowe, których fosforylacja jest konieczna dla aktywności biologicznej fototropin; kolor jasnoniebieski – pozostałe miejsca fosforylacji). Na podstawie [38]

**FIGURE 2.** Schematic representation of phototropin structure and conformation changes induced by blue light. FMN, flavin mononucleotide; J $\alpha$ , J $\alpha$ -helix; LOV; Light-, Oxygen-, Voltage-sensing domain; P – phosphorylation sites (dark blue – conserved serine residues whose phosphorylation is necessary for the biological activity of phototropin; light blue – other phosphorylation sites). Based on [38]

kinazy serynowo-treoninowej, należącej do grupy kinaz białkowych AGCVIII (AGC – *cAMP-dependent protein kinase A*, *cGMP – dependent protein kinase G* and *phospholipid-dependent protein kinase C*). W ciemności FMN jest związany niekowalencyjnie, a domena LOV2 jest zasocjowana z domeną kinazową [62] (ryc. 2). Pierwszym etapem transdukcji sygnału świetlnego przez fototropiny jest powstanie wiązania kowalencyjnego między flawiną a konserwatywną resztą cysteiny w domenie LOV [19]. Szybszy przebieg reakcji w domenach LOV2 obu fototropin decyduje o głównej roli tych domen w aktywności fotoreceptorów [16]. Wykazano dominującą aktywność LOV2 w następujących odpowiedziach fototropinowych: fototropizmie, rozwoju blaszki liściowej, ustawianiu liści i akumulacji chloroplastów [32]. Domena LOV1 pełni natomiast rolę modulującą aktywność LOV2 [46, 62]. Pod wpływem aktywacji przez światło następują zmiany konformacyjne w LOV2 i przylegającym fragmencie białka tzw. J $\alpha$ -helisie [35]. Skutkuje to osłabieniem oddziaływania LOV2 z domeną kinazową i aktywacją tej ostatniej, prowadzącą do autofosforylacji fotoreceptora [15] (ryc. 2). W obu fototropinach zidentyfikowano liczne miejsca fosforylacji, lecz jedynie fosforylacja dwóch seryn w C-końcowej części obu białek wpływa na ich aktywność biologiczną [10, 23, 38, 40]. Spośród pozostałych miejsc fosforylacji część jest fosforylowana w sposób zależny od światła (inaczej dla phot1 i phot2), a część niezależnie [10]. Dezaktywacja fototropin następuje po defosforylacji konserwa-

tywnych reszt serynowych w części C-końcowej. Dotychczas znana jest tylko jedna fosfataza specyficzna dla fototropiny2 – fosfataza białkowa 2A (PP2A), a za jej oddziaływanie z phot2 odpowiada podjednostka regulatorowa RCN1 [92]. Uważa się, że do dalszego przekazu sygnału konieczna jest też fosforylacja innych białek przez fototropiny. Prawdopodobnie za różnorodność odpowiedzi fototropinowych odpowiada szereg różnych białek fosforylowanych przez kinazy fototropinowe, specyficznych dla poszczególnych procesów fizjologicznych. Dotychczas jednak poznano tylko trzy substraty kinaz fototropinowych: ABCB19 (ang. *ATP-Binding Cassette B19*), PKS4 (ang. *Phytochrome Kinase Substrate 4*) i BLUS1 (ang. *Blue Light Signaling1*). ABCB19 i PKS4 są fosforylowane przez fototropinę1 i zaangażowane w fototropizm [17, 22]. W przypadku PKS4 wykazano też udział fosfatazy PP2A w defosforylacji tego białka. BLUS1 jest natomiast fosforylowane przez obie fototropiny i bierze udział w otwieraniu aparatów szparkowych [88]. Zidentyfikowano też kilkadziesiąt innych białek oddziałujących z fototropinami, jednak w większości przypadków ich rola w przekazie sygnału jest wciąż nieznana [39]. Żadne z tych białek nie bierze udziału we wszystkich odpowiedziach fototropinowych, a część z nich oddziałuje specyficznie tylko z jedną fototropiną.

Dla wyjaśnienia mechanizmu ruchu chloroplastów szczególnie ważne jest zrozumienie zjawiska “przełączania” między reakcją akumulacji i ucieczki w zmiennych warunkach oświetlenia. Wiele przesłanek wskazuje bowiem na to, że odpowiedzi te są kontrolowane przez odrębne ścieżki sygnałowe. Istotną rolę wydają się odgrywać różnice we właściwościach obu fototropin. Fototropina1 wykazuje większą wrażliwość na światło i może wywołać jedynie reakcję akumulacji. Fototropina2 może natomiast wywoływać obie reakcje, w zależności od natężenia światła. Do zrozumienia strukturalnych podstaw tych różnic przyczynił się eksperyment polegający na zamianie domen N- i C-końcowych obu fototropin [3]. Wykazano, że za wrażliwość na światło odpowiada część N-końcowa białka, a dokładnie czas życia adduktu między FMN a konserwatywną resztą cysteiny w domenie LOV2 [66].

Oba białka złożone z domen różnych fototropin miały natomiast zdolność wywoływania ucieczki chloroplastów. Stwierdzono zatem, że kontrolowanie reakcji ucieczki jest podstawową funkcją fototropin, która została utracona w fototropinie1. W mutancie *phot2* można zaobserwować szczątkową reakcję ucieczki wywoływaną przez fototropinę1 [58]. Równie ważne dla funkcjonowania fototropin mogą być różnice we wzorach ekspresji i lokalizacji wewnątrzkomórkowej. W ciemności fototropiny są związane z błoną komórkową. Pod wpływem światła niebieskiego część cząsteczek fototropiny1 przemieszcza się do cytoplazmy [73], a fototropiny2 – do aparatu Golgiego [2]. Ponadto pewna frakcja fototropin (zwłaszcza *phot2*) pozostaje związana z otoczką chloroplastów [53]. Za lokalizację błonową obu fototropin odpowiadają niewielkie fragmenty domen C-końcowych [52]. Wykazano też, że C-końcowy fragment fototropiny2 o długości 42 aminokwasów jest niezbędny

do translokacji fotoreceptora do aparatu Golgiego i otoczki chloroplastu oraz do wywołania reakcji akumulacji chloroplastów, lecz nie jest konieczny do wywołania innych odpowiedzi fototropinowych takich jak fototropizm i spłaszczenie liści [52, 53]. Może to wskazywać na znaczenie lokalizacji fototropin w przekazie sygnału. Z drugiej strony wykazano, że zakotwiczenie fototropiny 1 w błonie komórkowej, a tym samym zahamowanie jej internalizacji do cytoplazmy, nie zaburza takich odpowiedzi fototropinowych jak fototropizm, spłaszczenie i ustawianie liści oraz akumulacja chloroplastów [69]. Istotną rolę w regulacji odpowiedzi fototropinowych może też odgrywać degradacja fotoreceptorów, zachodząca prawdopodobnie na innej drodze dla fototropiny 1 i 2 [2, 70]. Ekspresja obu fototropin jest silnie regulowana przez światło na poziomie mRNA. Pod wpływem światła białego ilość transkryptu *PHOT1* w liściach *A. thaliana* maleje, a ilość *PHOT2* wzrasta [59]. W regulacji tej uczestniczą inne fotoreceptory – fitochromy i kryptochromy – a wzorzec ekspresji jest zachowany przez cały okres życia rośliny. Co ciekawe, ekspresja fototropin na poziomie białka wydaje się niewrażliwa na wpływ światła, może być natomiast regulowana przez inne czynniki np. temperaturę i fitohormony [26, 60]. Wykazano, że różne reakcje fototropinowe, w tym akumulacja i ucieczka chloroplastów, mogą być regulowane przez poziom fotoreceptorów [24, 49]. Ostatnio, na podstawie reakcji chloroplastów na krótkie impulsy światła, zaproponowano mechanizm regulacji odpowiedzi fototropinowych na drodze oddziaływań między tymi białkami, poprzez tworzenie homo- i heterokompleksów [84].

## UKŁAD EFEKTOROWY RUCHU CHLOROPLASTÓW

Cytoszkielek aktynowy jest niewątpliwie podstawowym elementem układu efektorowego ruchu chloroplastów. W szeregu gatunków wykazano, że inhibitory powodujące depolimeryzację filamentów aktynowych (cytochalazyna B i D, latrunkulina B), hamują ruchy chloroplastów [5, 41, 47, 90]. Cytoszkielek mikrotubularny nie uczestniczy natomiast w ruchu chloroplastów w wyższych roślinach lądowych. Jego stabilizacja lub depolimeryzacja nie powoduje zaburzenia kierunkowych przemieszczeń chloroplastów [5, 47]. Mikrotubule nie wykazują też przestrzennej asocjacji z chloroplastami, w przeciwieństwie do filamentów aktynowych. Przy użyciu różnych metod obrazowania aktyny w utrwalonych i żywych komórkach pokazano, że chloroplasty są otoczone siecią mikrofilamentów, tworzących tzw. koszyki aktynowe [4, 47, 55].

Dokładna rola aktyny w mechanizmie ruchu chloroplastów w lądowych roślinach nasiennych jest jednak przedmiotem kontrowersji. Obecnie rozważane są dwie hipotezy: jedna zakłada współdziałanie aktyny z miozynami w celu generowania ruchu [54], druga natomiast proponuje mechanizm oparty wyłącznie na zależnej od światła reorganizacji drobnych włókien aktynowych, tzw. aktyny

chloroplastowej (cp-aktyny) [44]. Istnieją liczne wyniki badań przemawiające zarówno za i przeciw każdej z tych hipotez. Układ aktyno-miozynowy bierze udział w ruchu większości organelli roślinnych, m. in. aparatu Golgiego, mitochondriów i peroksosomów [13]. W roślinach występują wyłącznie miozyny klasy VIII i XI, specyficzne dla tej grupy organizmów. Za ich zaangażowaniem w ruch chloroplastów przemawiają m. in. następujące przesłanki: zależna od światła niebieskiego lokalizacja tych białek na powierzchni chloroplastów oraz brak specyficznych zmian w strukturze cytoszkieletu aktynowego związanych z ruchem chloroplastów. Obecność miozyn, zarówno klasy VIII jak i XI, na powierzchni chloroplastów została wykazana przy użyciu przeciwciał [54, 94, 98] oraz fluorescencyjnych białek fuzyjnych [34, 63]. W *A. thaliana*, w słabym świetle niebieskim miozyny pozostają zasocjowane z otoczką chloroplastów, natomiast pod wpływem silnego światła ulegają przemieszczeniu do cytozolu. Efekt ten nie występuje pod wpływem światła czerwonego, ani w mutancie *phot2* [54]. Zaproponowano zatem miozynę jako ostateczny element szlaku sygnałowego od fototropiny2, prowadzącego do ucieczki chloroplastów. Co ciekawe, zastosowanie inhibitorów miozyn powoduje jednak zahamowanie reakcji akumulacji, a nie ucieczki [67]. Hipoteza udziału miozyn zakłada, że ruch generowany jest przez białka motoryczne, a wiązki filamentów aktynowych stanowią jedynie „tory” dla poruszających się organelli. Brak specyficznej reorganizacji cytoszkieletu aktynowego pod wpływem światła niebieskiego wydaje się zatem zgodny z tym założeniem. Obserwowano jedynie zmiany wywołane silnym światłem czerwonym w mutancie *phot2 A. thaliana* [55] lub silnym światłem niebieskim i czerwonym w *N. tabacum* [4]. Reakcje ruchowe chloroplastów nie są więc związane z dynamicznymi zmianami w strukturze cytoszkieletu aktynowego. Rola miozyn w ruchu chloroplastów nie została jednak potwierdzona w doświadczeniach z użyciem mutantów miozynowych (mutacje w genach miozyn klasy XI) *A. thaliana* [68] oraz roślin *Nicotiana benthamiana* z nadekspresją sześciu нефunkcjonalnych miozyn (VIII-1, 2, B; XI-2, F, K) [6]. Może to być spowodowane redundancją funkcji poszczególnych miozyn lub udziałem innych, niebadanych miozyn w ruchu chloroplastów. W żadnej z tych prac nie przetestowano bowiem wszystkich miozyn występujących w danym gatunku.

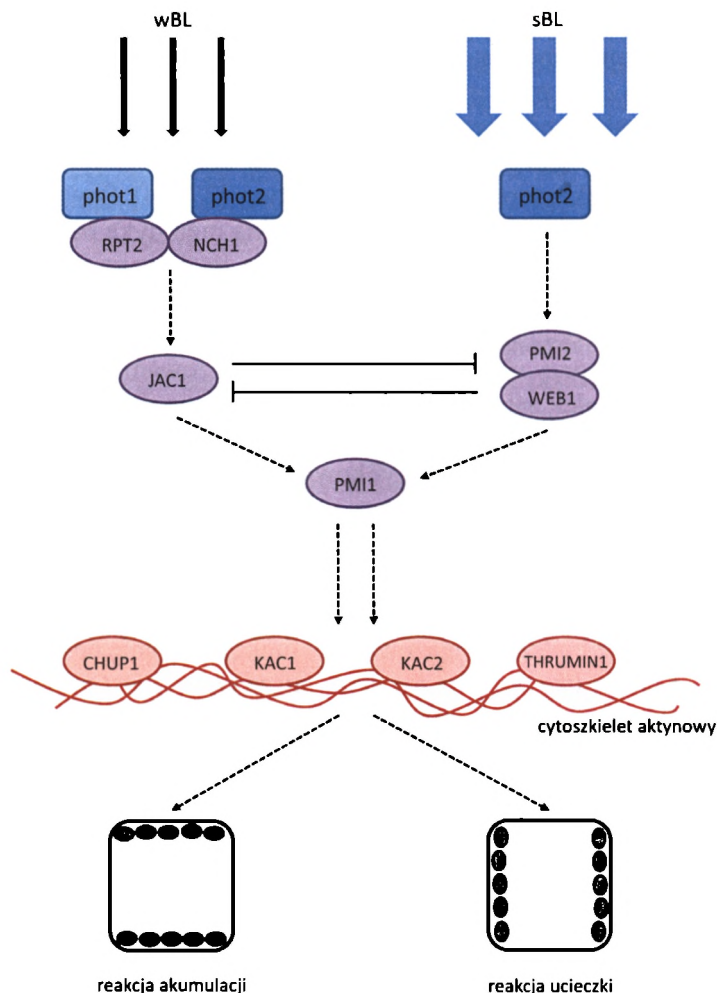
Drugi, całkowicie odmienny model zakłada, że to aktyna jest białkiem generującym ruch chloroplastów oraz ostatecznym ogniwem ścieżki przekazu sygnału świetlnego od fototropin. Taki pogląd jest oparty na obserwacjach dynamicznej reorganizacji krótkich włókien aktynowych (cp-aktyny), związanych z chloroplastami, podczas ruchów tych organelli wywołanych światłem niebieskim w *A. thaliana* [44]. Cp-aktyna została zwizualizowana przy użyciu białka fuzyjnego GFP-talina mysia (białko wiążące aktynę). Występuje ona między chloroplastami a błoną komórkową i wykazuje właściwości odmienne od aktyny kortykalnej. W ciemno-



ści, gdy chloroplasty pozostają stacjonarne, włókna cp-aktyny są widoczne wokół całego obwodu chloroplastu. Gdy chloroplasty zaczynają się przemieszczać pod wpływem światła niebieskiego następuje reorganizacja cp-aktyny do ułożenia „spolaryzowanego” – włókna aktynowe gromadzą się na „przednim”, wiodącym końcu chloroplastu. Podczas reakcji ucieczki, w przeciwieństwie do akumulacji, rearanżacja cp-aktyny poprzedzona jest jej chwilowym zanikiem. Na podstawie tych obserwacji zaproponowano rolę cp-aktyny w kotwiczeniu chloroplastów do błony komórkowej oraz wywoływaniu ruchu chloroplastów poprzez ich ciągnięcie. Hipoteza ta zyskała potwierdzenie w doświadczeniach na mutantach fototropinowych *A. thaliana*. Brak reakcji ruchowych w mutantach *phot2* i *phot1phot2* był skorelowany z brakiem reorganizacji cp-aktyny [37, 44]. Powyższy model budzi jednak pewne zastrzeżenia ze względu na użytą metodykę badań. Obserwacje były wykonywane głównie w komórkach ogonka liściowego lub protoplastach, po naświetlaniu mikrowiązką światła niebieskiego o bardzo wysokim natężeniu, a zatem w warunkach odbiegających od fizjologicznych. Obecność cp-aktyny nie została potwierdzona przy użyciu innych metod obrazowania aktyny [4, 55, 97].

Odkrycie kilku białek zaangażowanych w organizację aktyny stanowi dodatkowo potwierdzenie udziału cytoszkieletu aktynowego w mechanizmie ruchu chloroplastów (ryc. 3). Jako pierwsze zidentyfikowano białko CHUP1 (ang. *Chloroplast Unusual Positioning1*) obecne na otoczce chloroplastu i odpowiedzialne za ich kotwiczenie w błonie komórkowej [65]. Oddziałuje ono z aktyną i profiliną [93]. Mutant *chup1* nie wykazuje ruchów chloroplastów, a rozmieszczenie tych organelli w komórkach jest zaburzone. W roślinach tych nie obserwowano też włókien cp-aktyny [44]. Kolejne białka zaangażowane w funkcjonowanie cp-aktyny to KAC1 i KAC2 (ang. *Kinesin like proteins for Actin based chloroplast movement*). Należą one do rodziny kinezyn, lecz nie wykazują aktywności ATPazowej ani oddziaływania z mikrotubulami [80]. Mutacja *kac2* nie wpływa na ruchy chloroplastów, lecz mutacja *kac1* powoduje ich znaczące zahamowanie. Podwójny mutant *kac1kac2* ma natomiast bardzo podobny fenotyp do *chup1*. Na tej podstawie zaproponowano, że podobnie jak CHUP1, białka KAC (w szczególności KAC1) uczestniczą w pozycjonowaniu chloroplastów oraz światłozależnej rearanżacji cp-aktyny. THRUMIN1 to natomiast białko zasocjowane z błoną komórkową, mające zdolność wiązania filamentów aktynowych [97]. Oddziaływanie tego białka z aktyną jest specyficznie regulowane przez światło niebieskie i fototropiny. Mutant *thrumin1* również wykazuje upośledzenie obu reakcji chloroplastowych. Białko THRUMIN1 może zatem odgrywać rolę w ruchu chloroplastów poprzez światłozależną reorganizację cytoszkieletu aktynowego związanego z błoną komórkową. Białka CHUP1, KAC1 i THRUMIN1 wykazują zależną od światła fosforylację. W przypadku THRUMIN1 wykazano, że fosforylacja tego białka jest konieczna do prawidłowej odpowiedzi chloroplastów na światło [10]. W przemodelowanie aktyny za-

angażowana jest też fosfataza białkowa zawierająca podjednostkę katalityczną PP2A-2, działająca poprzez regulację aktywności kompleksu ADF(ang. *Actin Depolymerizing Factor*)/kofilina. Zaobserwowano, że aktywność tej fosfatazy jest konieczna do reakcji ucieczki chloroplastów [96].



**RYCINA 3.** Białka zaangażowane w przekaz sygnału świetlnego w kontroli ruchu chloroplastów. Kolor niebieski – fotoreceptory, kolor czerwony – białka oddziałujące z cytoskieletem aktynowym, kolor fioletowy – pozostałe białka uczestniczące w przekazie sygnału. wBL – słabe światło niebieskie, sBL – silne światło niebieskie. Na podstawie [9, 82]

**FIGURE 3.** Proteins involved in the signaling pathway controlling chloroplast movements. Blue – photoreceptors, red – proteins interacting with the actin cytoskeleton, violet – other proteins participating in signal transduction. wBL – weak blue light, sBL – strong blue light. Based on [9, 82]

Opisane powyżej dwa modele układu efektorowego ruchu chloroplastów zdecydowanie się różnią, posiadają jednak punkty wspólne, w szczególności cytoszkielet aktynowy. Być może oba modele wcale się nie wykluczają, lecz stanowią elementy bardziej złożonego mechanizmu. Ostatnio zaproponowano ciekawe połączenie roli miozyny i cp-aktyny w ruchu chloroplastów. Miozyna ATM1 z *A. thaliana*, należąca do klasy VIII, związana jest głównie z siecią F-aktyny [34]. Na podstawie właściwości tej miozyny wysunięto hipotezę, że może ona uczestniczyć w percepcji lub tworzeniu naprężeń mechanicznych w różnych strukturach komórkowych [13]. Wykazano też rolę miozyny w dynamicznej reorganizacji aktyny [77]. Być może zatem miozyny mogą regulować rearanżację cp-aktyny i jej oddziaływanie z błoną komórkową.

## ELEMENTY SZLAKU SYGNAŁOWEGO W RUCHU CHLOROPLASTÓW

Dotychczas stosunkowo niewiele wiadomo na temat przekazu sygnału od fototropin do układu efektorowego ruchu chloroplastów. Poznano tylko kilka białek (m. in. PM11, PM12, WEB1, JAC1, RPT2, NCH1) oraz wtórne przekaźniki sygnału – fosfatydyloinozytole i jony wapnia – zaangażowane w ten proces. Niektóre z nich odgrywają specyficzne role w akumulacji i ucieczce chloroplastów, co wskazuje na istnienie odrębnych szlaków sygnałowych kontrolujących obie reakcje. Przemawia za tym również różny szacunkowy czas życia sygnałów wywołujących obie odpowiedzi – kilkakrotnie dłuższy dla akumulacji niż dla ucieczki [36].

## BIAŁKA ZAANGAŻOWANE W PRZEKAZ SYGNAŁU W RUCHU CHLOROPLASTÓW

Spośród białek zaangażowanych w przekaz sygnału w ruchu chloroplastów tylko PM11 (ang. *Plastid Movement Impaired1*) jest istotne zarówno dla akumulacji jak i ucieczki chloroplastów (ryc. 3). Mutant *pmi1* wykazuje silne zahamowanie obu reakcji [21]. Gen *PM11* koduje białko o bliżej nieokreślonej funkcji, zawierające na N-końcu domenę C2 (NT-C2), która wydaje się być istotna dla jego aktywności. W mutancie *pmi1* wykazano też zmiany w dynamice cp-aktyny, co może wskazywać, że PM11, podobnie jak inne białka z rodziny NT-C2, odgrywa rolę w regulacji funkcjonowania cytoszkieletu aktynowego [81]. Ponadto wykazano, że PM11 jest również niezbędne dla ruchu jąder pod wpływem światła niebieskiego i zasugerowano, że białko to odgrywa rolę przede wszystkim w odpowiedziach kontrolowanych przez fototropinę2. Spośród dwóch homologów PM11 w *A. thaliana*, PMIR (ang. *Plastid*

*Movement Impaired1-Related*) 1 i 2, tylko dla PMIR1 wykazano udział w ruchu chloroplastów, w komórkach epidermy [81].

Mutant *jac1* ma upośledzoną jedynie reakcję akumulacji, co wskazuje na rolę białka JAC1 (ang. *J-domain protein required for chloroplast Accumulation response1*) w odpowiedzi na słabe światło [79]. W białku tym występuje domena J, podobna jak w auksynie, zawierająca konserwatywny motyw HPD (histydyna, prolina, kwas asparaginowy), który jest istotny dla funkcjonowania JAC1 w ruchu chloroplastów [86]. Przypuszcza się, że domena J białka JAC1 może odpowiadać za jego oddziaływanie z białkiem opiekuńczym Hsc70 (ang. *Heat shock cognate protein 70*) i udział w endocytozie klatryno-zależnej. Wykazano też, że JAC1 może uczestniczyć w reorganizacji cp-aktyny podczas reakcji ucieczki [37]. W akumulacji chloroplastów uczestniczą też dwa białka oddziałujące z fototropinami, RPT2 (ang. *Root Phototropism2*) i NCH1 (ang. *NRL protein for Chloroplast movement1*), należące do tej samej rodziny NRL (ang. *NPH3/RPT2-Like*) [82]. Białka te wykazują redundancję funkcjonalną: w podwójnym mutancie *rpt2nch1* nie występuje reakcja akumulacji, natomiast w pojedynczych mutantach *rpt2* i *nch1* jest ona jedynie nieznacznie zahamowana.

Mutanty *pmi2* i *web1* mają podobny fenotyp: spowolnione obie reakcje chloroplastowe, zwłaszcza ucieczkę [50, 57]. Białka PMI2 (*Plastid Movement Impaired2*) i WEB1 (ang. *Weak chloroplast movements under Blue light1*) wykazują podobieństwa strukturalne – domeny typu coiled-coil i niefunkcjonalny sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *Nuclear Localization Signal*, NLS) – i należą do tej samej rodziny DUF827, nazwanej później WPR (ang. *WEB1/PMI2-Related*) [51]. Wykazano, że WEB1 i PMI2 oddziałują ze sobą oraz, że mutacja *jac1* powoduje supresję fenotypu *web1* i *pmi2* [50]. Na tej podstawie zaproponowano model, w którym białko JAC1 pośredniczy w reakcji akumulacji i hamuje reakcję ucieczki, a w silnym świetle jego aktywność jest z kolei hamowana przez kompleks WEB1-PMI2. Zidentyfikowano ponadto jeszcze jedno białko z rodziny WPR zaangażowane w ruch chloroplastów – PMI15 [57]. Mutant *pmi15* ma nieznacznie zahamowaną reakcję ucieczki. W podwójnym mutancie *pmi2pmi15* zaburzona jest również reakcja akumulacji, co wskazuje na udział PMI2 i PMI15 także w tej odpowiedzi.

Białka PMI1, JAC1 i WEB1, podobnie jak CHUP1, KAC1 i THRUMIN1, są fosforylowane w sposób zależny od światła [10]. Wynik ten przemawia za funkcjonowaniem kaskady fosforylacji białek w przekazie sygnału świetlnego kontrolującego ruch chloroplastów.

## **WTÓRNE PRZEKAŹNIKI SYGNAŁU W RUCHU CHLOROPLASTÓW**

Rola jonów wapnia jako wtórnych przekazników sygnału opiera się na wytwarzaniu tzw. "sygnatur wapniowych" czyli przejściowych, czasowo i przestrzennie specyficznych oscylacji stężenia wapnia w komórce. W mobilizacji wapnia pod

wpływem światła niebieskiego uczestniczą obie fototropiny, odgrywają one jednak różne role. Fototropina1 odpowiada za napływ wapnia z apoplastu do wnętrza komórki, natomiast fototropina2 również za zależny od aktywności fosfolipazy C wypływ wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych, np. z wakuoli lub retikulum endoplazmatycznego [7, 33]. Zidentyfikowano też w błonie komórkowej kanały wapniowe aktywowane przez fototropiny (ang. *Phototropin-Activated Calcium-permeable Channel*, PACC) [78]. Ostatnio przy użyciu mikroanalizy rentgenowskiej pokazano specyficzne dla światła niebieskiego, zależne od fototropiny2 zmiany w lokalizacji wapnia w mezofilu *A. thaliana* [61].

Na przykładzie różnych grup taksonomicznych, od zielenic do roślin okrytozależkowych, wykazano, że jony wapnia odgrywają istotną rolę w ruchu chloroplastów [9]. Szereg substancji zaburzających homeostazę wapniową powodował zahamowanie ruchu chloroplastów: EGTA (chelator  $\text{Ca}^{2+}$ ), kofeina (powoduje uwolnienie  $\text{Ca}^{2+}$  z przedziałów wewnątrzkomórkowych), tapsigargina (inhibitor  $\text{Ca}^{2+}$  – ATPazy w błonie ER), nifedipina i verapamil (inhibitory kanałów wapniowych), oraz trifluoperazyna (inhibitor kalmoduliny) [4, 89, 90]. W *N. tabacum* zahamowaniu ruchu chloroplastów przez EGTA lub trifluoperazynę towarzyszyły znaczące zaburzenia w strukturze cytoszkieletu aktynowego oraz agregacja chloroplastów [4]. Zmiany te ulegały częściowemu odwróceniu po dodaniu jonów wapnia lub magnezu, przy czym działanie jonów magnezu było silniejsze. Wyżej opisane wyniki jednoznacznie wskazują na udział jonów wapnia w ruchu chloroplastów, lecz ich dokładna funkcja wciąż pozostaje niewyjaśniona. Z jednej strony fototropiny kontrolują bardzo specyficzne zmiany lokalizacji wapnia w komórce [61]. Z drugiej strony bezkierunkowe podanie jonów wapnia do komórek wystarcza, aby przywrócić ruchy chloroplastów zahamowane przez substancje zaburzające homeostazę wapniową [4]. Nieznana pozostaje też rola jonów magnezu w ruchu chloroplastów. Być może jest ona związana z regulacją aktywności miozyny i – pośrednio – architektury cytoszkieletu aktynowego [34].

Drugim rodzajem wtórnych przekazników sygnału zaangażowanych w ruch chloroplastów są fosfatydyloinozytyle. Specyficzna regulacja różnych procesów fizjologicznych przez te fosfolipidy możliwa jest dzięki współdziałaniu szeregu enzymów, głównie kinaz i fosfataz, w precyzyjnej kontroli ilości poszczególnych fosfatydyloinozytoli [11]. Różnią się one ilością i pozycją reszt fosforanowych w pierścieniu inozytoli. Do odpowiedzi fototropinowych, w których uczestniczy szlak fosfatydyloinozytoli należą: ruch aparatów szparkowych [56], zahamowanie wzrostu hipokotyla [14] i fototropizm [75]. Wykazano, że fosfatydyloinozytyle pośredniczą w zmianach stężenia jonów wapnia w komórce występujących w dwóch pierwszych reakcjach.

Udział szlaku fosfatydyloinozytoli w ruchu chloroplastów zaproponowano na podstawie wyników doświadczeń z użyciem wortmaniny – inhibitora kinazy 3-fosfatydyloinozytoli. W *L. trisulca* i *N. tabacum* inhibitor ten wybiórczo hamował akumulację chloroplastów, a dopiero w wyższych stężeniach również ucieczkę, co sugerowało funkcjonowanie odrębnych ścieżek sygnałowych w kontroli obu reakcji [4,

30]. Co ciekawe, w *N. tabacum* działanie wortmaniny było znoszone przez podanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{Mg}^{2+}$ . Ostatnio w badaniach na *A. thaliana* z użyciem specyficznych inhibitorów wykazano, że regulacja ruchów chloroplastów przez fototropinę2 jest zależna od hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu [PI(4,5)P<sub>2</sub>] przez fosfolipazę C. Z kolei w kontroli reakcji akumulacji przez obie fototropiny odgrywa rolę fosforylacja fosfatydyloinozytoli przez kinazę 3-fosfatydyloinozytoli (PI3K) i kinazę 4-fosfatydyloinozytoli (PI4K) [1]. Inhibicja wyżej wymienionych reakcji nie tylko hamuje ruchy chloroplastów, lecz również znacząco redukuje wzrost stężenia wapnia w cytozolu pod wpływem światła niebieskiego. Wyniki te wskazują na fosfatydyloinozytoli jako ogniwo łączące fototropiny i jony wapnia w przekazie sygnału w ruchu chloroplastów i potwierdzają istnienie osobnych ścieżek sygnałowych dla obu reakcji.

## INTERAKCJE Z INNYMI SZLAKAMI SYGNAŁOWYMI

Ruchy chloroplastów służą optymalizacji funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. W tym celu chloroplasty muszą reagować nie tylko na światło niebieskie, lecz również na inne czynniki zewnętrzne, które mogą mieć wpływ na wydajność fotosyntezy. Dzięki oddziaływaniom pomiędzy szlakami przekazu sygnału od fototropin a innymi ścieżkami sygnałowymi możliwe jest dostosowanie odpowiedzi chloroplastów do warunków środowiska oraz innych procesów fizjologicznych zachodzących w roślinie.

Należałoby się spodziewać, że do wydajnej regulacji fotosyntezy konieczny jest szybki przekaz informacji zwrotnej od aparatu fotosyntetycznego do układu efektorowego ruchu chloroplastów. Dotychczas jednak nie udało się zidentyfikować takiego mechanizmu. Inhibitory transportu elektronów w fazie jasnej fotosyntezy (DCMU, metylowiologen) nie wpływały na ruch chloroplastów w *A. thaliana* i *N. tabacum* [64, 85]. DCMU powodował natomiast niewielki spadek ekspresji *PHOT2* [59]. Efekt ten występował jednak zarówno w ciemności jak i na świetle, co wskazuje, że raczej nie jest on związany z fotosyntezą. Zbadano też wpływ cukrów, jako produktów fazy ciemnej fotosyntezy, na ruchy chloroplastów, stosując dwa modele doświadczalne: bezpośrednią inkubację odciętych liści na agarze z cukrem (glukoza, sacharoza) oraz hodowlę *in vitro* na pożywkach z dodatkiem cukru [8, 25]. W pierwszym przypadku zaobserwowano silne zahamowanie ruchu chloroplastów pod wpływem cukrów, w drugim wyższe stężenia cukrów nie wpływały na parametry ruchów chloroplastów z wyjątkiem szybkości reakcji ucieczki. Hamującemu wpływowi cukrów przeciwdziałała nadekspresja *PHOT2* [8], jednak cukry nie powodowały spadku ekspresji fototropin [8, 25]. Ich działanie polega zatem prawdopodobnie na wywoływaniu zmian w ekspresji innych genów.

W lądowych roślinach nasiennych ruchy chloroplastów są co prawda indukowane tylko przez światło niebieskie za pośrednictwem fototropin, lecz liczne przesłanki potwierdzają udział fitochromów w ich regulacji. Wykazano, że fitochrom B (phyB) wywiera hamujący wpływ na reakcję ucieczki poprzez interakcję z obiema fototropinami [20, 58]. Zaproponowano też udział fitochromów w kontroli “przełączania” między reakcją akumulacji i ucieczki [20]. Jednoczesne nasświetlanie światłem niebieskim i czerwonym lub daleką czerwienią nie wpływało istotnie na ruch chloroplastów [20]. Reakcja akumulacji w mutantach *phot1* i *phot2* była natomiast znacząco zwiększona po zastosowaniu krótkiego impulsu światła czerwonego 2 godziny przed włączeniem światła niebieskiego [32]. Efekt ten był niwelowany przez impuls dalekiej czerwieni następujący bezpośrednio po impulsie światła czerwonego i zależny od phyA. Niewiele jednak wiadomo na temat molekularnych podstaw interakcji między fitochromami a ścieżką sygnałową kontrolującą ruch chloroplastów. Fitochromy wraz z kryptochromami uczestniczą w regulacji ekspresji genów *PHOT1* i *PHOT2*, co może być istotne dla adaptacji do warunków świetlnych [59]. Za szybkie odpowiedzi na światło czerwone odpowiedzialne są prawdopodobnie inne mechanizmy. Impuls światła czerwonego hamuje przemieszczanie *phot1* z błony komórkowej do cytoplazmy indukowane światłem niebieskim [31]. Efekt ten wiąże się z modulacją fototropizmu przez światło czerwone, a zatem może odgrywać podobną rolę w ruchu chloroplastów. Ostatnio pokazano też, że *phot1* i phyA *A. thaliana* tworzą kompleksy związane z błoną komórkową, co może wskazywać na bezpośrednią interakcję fotoreceptorów [42].

Wpływ temperatury na ruchy chloroplastów został zbadany w kilku gatunkach lądowych roślin nasiennych, m. in. *Arabidopsis thaliana* [60]. Niskie temperatury (4-10 °C) spowalniają kinetykę reakcji, lecz jednocześnie zwiększają amplitudy reakcji ucieczki. Temperatury ok. 30 °C nieznacznie zwiększają szybkość ruchów, natomiast powyżej 35 °C może następować ich zahamowanie. W *A. thaliana* wykazano, że modulacja ruchów chloroplastów przez temperaturę może zależeć od zmian w ekspresji i wzajemnym stosunku ilości obu fototropin.

Jedną z funkcji ruchów chloroplastów jest ochrona aparatu fotosyntetycznego przed zbyt silnym światłem. W regulacji tej odpowiedzi uczestniczą więc prawdopodobnie inne szlaki sygnałowe aktywowane w warunkach stresu świetlnego. Silne światło sprzyja m. in. produkcji reaktywnych form tlenu. Zaproponowano udział nadtlenu wodoru w pozytywnej regulacji reakcji ucieczki [95]. Wpływ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ruch chloroplastów osłabiały zmiatacze wolnych rodników, takie jak katalaza, kwas askorbinowy i mannitol. Wykazano także udział kwasu abscysynowego i auksyn w modulacji ruchu chloroplastów [26, 27, 71]. Żaden z tych hormonów nie wydaje się być bezpośrednio zaangażowany w mechanizm ruchu chloroplastów. Badania mutantów wykazały, że kwas abscysynowy jest istotny zwłaszcza w regulacji reakcji ucieczki. Może to wskazywać na koordynację od-

powiedzi na stres świetlny i stres suszy, które w warunkach naturalnych występują często jednocześnie. Ponadto można się spodziewać, że szereg innych szlaków sygnałowych uczestniczy w modulacji ruchów chloroplastów, jednak doniesienia na ten temat są dotychczas stosunkowo nieliczne.

## PODZIĘKOWANIA

Finansowanie: Praca została sfinansowana z projektu „Wapniowe i świetlne sygnały w organizmach fotosyntetycznych”, akronim: CALIPSO, FP7, Marie Curie ITN nr kontraktu 607607

## LITERATURA

- [1] AGGARWAL C, ŁABUZ J, GABRYŚ H. Phosphoinositides play differential roles in regulating phototropin1-and phototropin2-mediated chloroplast movements in *Arabidopsis*. *PLOS One* 2013; **8**: e55393.
- [2] AGGARWAL C, BANAŚ AK, KASPROWICZ-MALUŚKI A, BORGHETTI C, ŁABUZ J, DOBRUCKI J, GABRYŚ H. Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *J Exp Bot* 2014; **65**: 3263-3276.
- [3] AIHARA Y, TABATA R, SUZUKI T, SHIMAZAKI KI, NAGATANI A. Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *Plant J* 2008; **56**: 364-375.
- [4] ANIELSKA-MAZUR A, BERNAS T, GABRYŚ H. *In vivo* reorganization of the actin cytoskeleton in leaves of *Nicotiana tabacum* L. transformed with plastin-GFP: Correlation with light-activated chloroplast responses. *BMC Plant Biol* 2009; **9**: 1-14.
- [5] AUGUSTYNOWICZ J, LEKKA M, BURDA K, GABRYŚ H. Correlation between chloroplast motility and elastic properties of tobacco mesophyll protoplasts. *Acta Physiol Plant* 2001; **23**: 291-302.
- [6] AVISAR D, PROKHNEVSKY AI, MAKAROVA KS, KOONIN EV, DOLJA VV. Myosin XI-K is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1098-1108.
- [7] BABOURINA O, NEWMAN I, SHABALA S. Blue light-induced kinetics of H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *P Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 2433-2438.
- [8] BANAŚ AK, GABRYŚ H. Influence of sugars on blue light-induced chloroplast relocations. *Plant Signal Behav* 2007; **2**: 221-230.
- [9] BANAŚ AK, AGGARWAL C, ŁABUZ J, SZTATELMAN O, GABRYŚ H. Blue light signalling in chloroplast movements. *J Exp Bot* 2012; **63**: 1559-1574.
- [10] BOEX-FONTVIEILLE E, JOSSIER M, DAVANTURE M, ZIVY M, HODGES M, TCHERKEZ G. Differential protein phosphorylation regulates chloroplast movement in response to strong light and darkness in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep* 2014; **32**: 987-1001.
- [11] BOSS WF, IM YJ. Phosphoinositide signaling. *Annu Rev Plant Biol* 2012; **63**: 409-429.
- [12] BRIGGS WR, CHRISTIE JM. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 204-210.
- [13] BUCHNIK L, ABU-ABIED M, SADOT E. Role of plant myosins in motile organelles: is a direct interaction required? *J Integr Plant Biol* 2015; **57**: 23-30.
- [14] CHEN X, LIN WH, WANG Y, LUAN S, XUE HW. An inositol polyphosphate 5-phosphatase functions in PHOTOTROPIN1 signaling in *Arabidopsis* by altering cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Plant Cell* 2008; **20**: 353-366.



- [15] CHRISTIE JM, REYMOND P, POWELL GK, BERNASCONI P, RAIBEKAS AA, LISCUM E, BRIGGS WR. Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 1998; **282**: 1698-1701.
- [16] CHRISTIE JM, SWARTZ TE, BOGOMOLNI RA, BRIGGS WR. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* 2002; **32**: 205-219.
- [17] CHRISTIE JM, YANG H, RICHTER GL, SULLIVAN S, THOMSON CE, LIN J, TITAPIWATANAKUN B, ENNIS M, KAISERLI E, LEE OR, ADAMEC J, PEER WA, MURPHY AS. phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLOS Biol* 2011; **9**: e1001076.
- [18] CHRISTIE JM, BLACKWOOD L, PETERSEN J, SULLIVAN S. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol* 2015; **56**: 401-413.
- [19] CROSSON S, MOFFAT K. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *P Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 2995-3000.
- [20] DEBLASIO SL, MULLEN JL, LUESSE DR, HANGARTER RP. Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in Arabidopsis. *Plant Physiology* 2003; **133**: 1471-1479.
- [21] DEBLASIO SL, LUESSE DL, HANGARTER RP. A plant-specific protein essential for blue-light-induced chloroplast movements. *Plant Physiol* 2005; **139**: 101-114.
- [22] DEMARSY E, SCHEPENS I, OKAJIMA K, HERSCH M, BERGMANN S, CHRISTIE J, SHIMAZAKI K, TOKUTOMI S, FANKHAUSER C. Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J* 2012; **31**: 3457-3467.
- [23] DENG Z, OSES-PRIO JA, KUTSCHERA U, TSENG TS, HAO L, BURLINGAME AL, WANG ZY, BRIGGS WR. Blue light-induced proteomic changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *J Proteome Res* 2014; **13**: 2524-2533.
- [24] DOI M, SHIGENAGA A, EMI T, KINOSHITA T, SHIMAZAKI KI. A transgene encoding a blue-light receptor, phot1, restores blue-light responses in the *Arabidopsis phot1 phot2* double mutant. *J Exp Bot* 2004; **55**: 517-523.
- [25] ECKSTEIN A, ZIĘBA P, GABRYŚ H. Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured in vitro. *J Plant Growth Regul* 2012; **31**: 90-101.
- [26] ECKSTEIN A, KRZESZOWIEC W, BANAŚ AK, JANOWIAK F, GABRYŚ H. Abscisic acid and blue light signaling pathways in chloroplast movements in *Arabidopsis mesophyll*. *Acta Bioch Pol* 2016; **63**: 449-458.
- [27] ECKSTEIN A, KRZESZOWIEC W, WALIGÓRSKI P, GABRYŚ H. Auxin and chloroplast movements. *Physiol Plantarum* 2016; **156**: 351-366.
- [28] GABRYŚ H, KRZESZOWIEC W. Chloroplast movements induced by light: diversity of mechanisms in various taxa. In Łaska G ed. *Biological diversity – from cell to ecosystem*. Białystok: Polish Botanical Society, 2012; 9-24.
- [29] GALVÃO VC, FANKHAUSER C. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Curr Opin Neurobiol* 2015; **34**: 46-53.
- [30] GRABALSKA M, MALEC P. Blue light-induced chloroplast reorientations in *Lemna trisulca* L. (Duckweed) are controlled by two separable cellular mechanisms as suggested by different sensitivity to wortmannin. *Photochem Photobiol* 2004; **79**: 343-348.
- [31] HAN IS, TSENG TS, EISINGER W, BRIGGS WR. Phytochrome a regulates the intracellular distribution of phototropin 1-green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2008; **20**: 2835-2847.
- [32] HAN IS, CHO HY, MONI A, LEE AY, BRIGGS WR. Investigations on the photoregulation of chloroplast movement and leaf positioning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 2013; **54**: 48-56.
- [33] HARADA A, SAKAI T, OKADA K. Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic  $Ca^{2+}$  differently in *Arabidopsis* leaves. *P Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8583-8588.
- [34] HARAGUCHI T, TOMINAGA M, MATSUMOTO R, SATO K, NAKANO A, YAMAMOTO K, ITO K. Molecular characterization and subcellular localization of *Arabidopsis* class VIII myosin, ATM1. *J Biol Chem* 2014; **289**: 12343-12355.
- [35] HARPER SM, NEIL LC, GARDNER KH. Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 2003; **301**: 1541-1544.

- [36] HIGA T, WADA M. Clues to the signals for chloroplast photo-relocation from the lifetimes of accumulation and avoidance responses. *J Integr Plant Biol* 2015; **57**: 120-126.
- [37] ICHIKAWA S, YAMADA N, SUETSUGU N, WADA M, KADOTA A. Red light, phot1 and JAC1 modulate phot2-dependent reorganization of chloroplast actin filaments and chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol* 2011; **52**: 1422-1432.
- [38] INOUE SI, KINOSHITA T, MATSUMOTO M, NAKAYAMA KI, DOI M, SHIMAZAKI KI. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *P Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 5626-5631.
- [39] INOUE SI, TAKEMIYA A, SHIMAZAKI KI. Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 587-593.
- [40] INOUE SI, MATSUSHITA T, TOMOKIYO Y, MATSUMOTO M, NAKAYAMA KI, KINOSHITA T, SHIMAZAKI KI. Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2011; **156**: 117-128.
- [41] IZUTANI Y, TAKAGI S, NAGAI R. Orientation movements of chloroplasts in Vallisneria epidermal cells: Different effects of light at low-and high-fluence rate. *Photochem Photobiol* 1990; **51**: 105-111.
- [42] JAEDICKE K, LICHTENTHÄLER AL, MEYBERG R, ZEIDLER M, HUGHES J. A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *P Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 12231-12236.
- [43] JARILLO JA, GABRYŚ H, CAPEL J, ALONSO JM, ECKER JR, CASHMORE AR. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 2001; **410**: 952-954.
- [44] KADOTA A, YAMADA N, SUETSUGU N, HIROSE M, SAITO C, SHODA K, ICHIKAWA S, KAGAWA T, NAKANO A, WADA M. Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 13106-13111.
- [45] KAGAWA T, SAKAI T, SUETSUGU N, OIKAWA K, ISHIGURO S, KATO T, TABATA S, OKADA K, WADA M. *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high light avoidance response. *Science* 2001; **291**: 2138-2141.
- [46] KAISERLI E, SULLIVAN S, JONES MA, FEENEY KA, CHRISTIE JM. Domain swapping to assess the mechanistic basis of *Arabidopsis* phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light. *Plant Cell* 2009; **21**: 3226-3244.
- [47] KANDASAMY MK, MEAGHER RB. Actin-organelle interaction: association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motil Cytoskel* 1999; **44**: 110-118.
- [48] KASAHARA M, KAGAWA T, OIKAWA K, SUETSUGU N, MIYAO M, WADA M. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 2002; **420**: 829-832.
- [49] KIMURA M, KAGAWA T. Blue light-induced chloroplast avoidance and phototropic responses exhibit distinct dose dependency of PHOTOTROPIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol* 2009; **85**: 1260-1264.
- [50] KODAMA Y, SUETSUGU N, KONG SG, WADA M. Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PM12, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 19591-19596.
- [51] KODAMA Y, SUETSUGU N, WADA M. Novel protein-protein interaction family proteins involved in chloroplast movement response. *Plant Signal Behav* 2011; **6**: 483-490.
- [52] KONG SG, KAGAWA T, WADA M, NAGATANI A. A C-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movement. *Plant Cell Physiol* 2013; **54**: 57-68.
- [53] KONG SG, SUETSUGU N, KIKUCHI S, NAKAI M, NAGATANI A, WADA M. Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiol* 2013; **54**: 80-92.
- [54] KRZESZOWIEC W, GABRYŚ H. Phototropin mediated relocation of myosins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 2007; **2**: 333-336.
- [55] KRZESZOWIEC W, RAJWA B, DOBRUCKI J, GABRYŚ H. Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light. *Biol Cell* 2007; **99**: 251-260.
- [56] LEE Y, LEE Y. Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements. *Plant Signal Behav* 2008; **3**: 211-213.

- [57] LUESSE DR, DeBLASIO SL, HANGARTER RP. *Plastid movement impaired 2*, a new gene involved in normal blue-light-induced chloroplast movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 1328-1337.
- [58] LUESSE DR, DeBLASIO SL, HANGARTER RP. Integration of phot1, phot2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movements. *J Exp Bot* 2010; **61**: 4387-4397.
- [59] ŁABUZ J, SZTATELMAN O, BANAŚ AK, GABRYŚ H. The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation. *J Exp Bot* 2012; **63**: 1763-1771.
- [60] ŁABUZ J, HERMANOWICZ P, GABRYŚ H. The impact of temperature on blue light induced chloroplast movements in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2015; **239**: 238-249.
- [61] ŁABUZ J, SAMARDAKIEWICZ S, HERMANOWICZ P, WYROBA E, PILARSKA M, GABRYŚ H. Blue light-dependent changes in loosely bound calcium in *Arabidopsis* mesophyll cells: an X-ray microanalysis study. *J Exp Bot* 2016; **67**: 3953-3964.
- [62] MATSUOKA D, TOKUTOMI S. Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *P Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 13337-13342.
- [63] NATESAN SKA, SULLIVAN JA, GRAY JC. Myosin XI is required for actin-associated movement of plastid stromules. *Mol Plant* 2009; **2**: 1262-1272.
- [64] NAUŠ J, ROLENCOVÁ M, HLAVÁČKOVÁ V. Is chloroplast movement in tobacco plants influenced systemically after local illumination or burning stress? *J Integr Plant Biol* 2008; **50**: 1292-1299.
- [65] OIKAWA K, YAMASATO A, KONG SG, KASAHARA M, NAKAI M, TAKAHASHI F, OGURA Y, KAGAWA T, WADA M. Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiol* 2008; **148**: 829-842.
- [66] OKAJIMA K, KASHOJIYA S, TOKUTOMI S. Photosensitivity of kinase activation by blue light involves the lifetime of a cysteinyl-flavin adduct intermediate, S390, in the photoreaction cycle of the LOV2 domain in phototropin, a plant blue light receptor. *J Biol Chem* 2012; **287**: 40972-40981.
- [67] PAVES H, TRUVE E. Myosin inhibitors block accumulation movement of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* leaf cells. *Protoplasma* 2007; **230**: 165-169.
- [68] PEREMYSLOV VV, PROKHNEVSKY AI, AVISAR D, DOLJA VV. Two class XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1109-1116.
- [69] PREUTEN T, BLACKWOOD L, CHRISTIE JM, FANKHAUSER C. Lipid anchoring of *Arabidopsis* phototropin 1 to assess the functional significance of receptor internalization: should I stay or should I go? *New Phytol* 2015; **206**: 1038-1050.
- [70] ROBERTS D, PEDMALE UV, MORROW J, SACHDEV S, LECHNER E, TANG X, ZHENG N, HANNINK M, GENSCHIK P, LISUM E. Modulation of phototropic responsiveness in *Arabidopsis* through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3-ring E3 ubiquitin ligase CRL3<sup>NPH1</sup>. *Plant Cell* 2011; **23**: 3627-3640.
- [71] ROJAS-PIERCE M, WHIPPO CW, DAVIS PA, HANGARTER RP, SPRINGER PS. PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1 mediates ABA sensitivity during germination and implicates ABA in light-mediated chloroplast movements. *Plant Physiol Biochem* 2014; **83**: 185-193.
- [72] SAKAI T, KAGAWA T, KASAHARA M, SWARTZ TE, CHRISTIE JM, BRIGGS WR, WADA M, OKADA K. *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *P Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6969-6974.
- [73] SAKAMOTO K, BRIGGS WR. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 2002; **14**: 1723-1735.
- [74] SAKURAI N, DOMOTO K, TAKAGI S. Blue-light-induced reorganization of the actin cytoskeleton and the avoidance response of chloroplasts in epidermal cells of *Vallisneria spiralis*. *Planta* 2005; **221**: 66-74.
- [75] SALINAS-MONDRAGON RE, KAJLA JD, PERERA IY, BROWN CS, SEDEROFF HW. Role of inositol 1,4,5-triphosphate signaling in gravitropic and phototropic gene expression. *Plant Cell Environ* 2010; **33**: 2041-2055.
- [76] SATO Y, WADA M, KADOTA A. Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *J Cell Sci* 2001; **114**: 269-279.
- [77] SOLDATI T. Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic* 2003; **4**: 358-366.

- [78] STOELZLE S, KAGAWA T, WADA M, HEDRICH R, DIETRICH P. Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *P Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 1456-1461.
- [79] SUETSUGU N, KAGAWA T, WADA M. An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005; **139**: 151-162.
- [80] SUETSUGU N, YAMADA N, KAGAWA T, YONEKURA H, UYEDA TQ, KADOTA A. (b) Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 8860-8865.
- [81] SUETSUGU N, HIGA T, KONG SG, WADA M. PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1 and PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1-RELATED1 mediate photorelocation movements of both chloroplasts and nuclei. *Plant Physiol* 2015; **169**: 1155-1167.
- [82] SUETSUGU N, TAKEMIYA A, KONG SG, HIGA T, KOMATSU A, SHIMAZAKI KI, KOHCHI T, WADA M. RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants. *P Natl Acad Sci USA* 2016; **113**: 10424-10429.
- [83] SZTATELMAN O, WALOSZEK A, BANAŚ AK, GABRYS H. Photoprotective function of chloroplast avoidance movement: *In vivo* chlorophyll fluorescence study. *J Plant Physiol* 2010; **167**: 709-716.
- [84] SZTATELMAN O, ŁABUZ J, HERMANOWICZ P, BANAŚ AK, BAZANT A, ZGLOBICKI P, AGGARWAL C, NADZIEJA M, KRZESZOWIEC W, STRZALKA W, GABRYS H. Fine tuning chloroplast movements through physical interactions between phototropins. *J Exp Bot* 2016; **67**: 4963-4978.
- [85] ŚLESIAK I, GABRYS H. Role of photosynthesis in the control of blue light induced chloroplast movement. Inhibitor study. *Acta Physiol Plant* 1996; **18**: 135-145.
- [86] TAKANO A, SUETSUGU N, WADA M, KOHDA D. Crystallographic and functional analyses of J-domain of JAC1 essential for chloroplast photorelocation movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2010; **51**: 1372-1376.
- [87] TAKEMIYA A, INOUE SI, DOI M, KINOSHITA T, SHIMAZAKI KI. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 2005; **17**: 1120-1127.
- [88] TAKEMIYA A, SUGIYAMA N, FUJIMOTO H, TSUTSUMI T, YAMAUCHI S, HIYAMA A, TADA Y, CHRISTIE JM, SHIMAZAKI KI. Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature Communications* 2013; **4**: 2094.
- [89] TLALKA M, FRICKER M. The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Plant J* 1999; **20**: 461-473.
- [90] TLALKA M, GABRYS H. Influence of calcium on blue-light-induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta* 1993; **189**: 491-498.
- [91] TROJAN A, GABRYS H. Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) depends on light conditions during growth. *Plant Physiol* 1996; **111**: 419-425.
- [92] TSENG TS, BRIGGS W. The *Arabidopsis rcn1-1* mutation impairs dephosphorylation of phot2, resulting in enhanced blue light responses. *Plant Cell* 2010; **22**: 392-402.
- [93] VON BRAUN SS, SCHLEIFF E. The chloroplast outer membrane protein CHUP1 interacts with actin and profilin. *Planta* 2008; **227**: 1151-1159.
- [94] WANG Z, PESACRETA TC. A subclass of myosin XI is associated with mitochondria, plastids, and the molecular chaperone subunit TCP-1 $\alpha$  in maize. *Cell Motil Cytoskel* 2004; **57**: 218-232.
- [95] WEN F, XING D, ZHANG L. Hydrogen peroxide is involved in high blue light-induced chloroplast avoidance movements in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2008; **59**: 2891-2901.
- [96] WEN F, WANG J, XING D. A protein phosphatase 2A catalytic subunit modulates blue light-induced chloroplast avoidance movements through regulating actin cytoskeleton in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2012; **53**: 1366-1379.
- [97] WHIPPO CW, KHURANA P, DAVIS PA, DEBLASIO SL, DESLOOVER D, STAIGER CJ, HANGARTER RP. THRU-MINI is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Current Biol* 2011; **21**: 59-64.

- [98] WOJTASZEK P, ANIELSKA-MAZUR A, GABRYŚ H, BALUŚKA F, VOLKMANN D. Recruitment of myosin VIII towards plastid surfaces is root-cap specific and provides the evidence for actomyosin involvement in root osmosensing. *Funct Plant Biol* 2005; **32**: 721-736.
- [99] ZURZYCKI J. Chloroplast arrangements as a factor in photosynthesis. *Acta Soc Bot Pol* 1955; **24**: 27-63.

*Redaktor prowadzący –*

*Otrzymano: 16.11.2016*

*Przyjęto: 21.12.2016*

*Aleksandra Eckstein*

*Zakład Biotechnologii Roślin, Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ*

*ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków*

*e-mail: [aleksandra.eckstein@uj.edu.pl](mailto:aleksandra.eckstein@uj.edu.pl)*

*tel. +48 12 664 63 47*

*fax +48 12 664 69 02*

